CHEMISCHE UND SEROLOGISCHE ERFORSCHUNG DER SALMONELLEN-LIPOPOLYSACCHARIDE

Inauguraldissertation
der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von
Heinz Kohler
von Wynigen (Bern)

Von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 15. Juli 1955

Der Dekan:
sig. *Prof. Dr. W. Feitknecht*

Gekürzte, von der Fakultät angenommene Fassung. Mikrofilmkopien der ungekürzten Dissertation sind von der Stadt- und Hochschulbibliothek Bern erhältlich.

Buchdruckerei Baumann AG, Bern — 1956

CHEMISCHE UND SEROLOGISCHE ERFORSCHUNG DER SALMONELLEN-LIPOPOLYSACCHARIDE

Inauguraldissertation
der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Bern
zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von
Heinz Kohler
von Wynigen (Bern)

Von der philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
auf Antrag des Herrn Prof. Dr. R. Signer angenommen.

Bern, den 15. Juli 1955

Der Dekan:
sig. *Prof. Dr. W. Feitknecht*

Gekürzte, von der Fakultät angenommene Fassung. Mikrofilmkopien der ungekürzten Dissertation sind von der Stadt- und Hochschulbibliothek Bern erhältlich.

Buchdruckerei Baumann AG, Bern — 1956

Die vorliegende Arbeit wurde im Schweiz. Serum- und Impfinstitut Bern unter der Leitung von Herrn P. D. Dr. med. R. Regamey ausgeführt.

Meinen verehrten Lehrern

Herrn P. D. Dr. med. R. Regamey

und

Herrn Prof. Dr. Hs. Nitschmann

möchte ich hiermit für ihr Wohlwollen und die vielen wertvollen Ratschläge herzlich danken.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

INHALTSVERZEICHNIS

Einleitung:

Seite

I. Bakterielle Antigene 1

II. Isolierung der Lipopolysaccharide 1

III. Serologische und chemische Eigenschaften 4

IV. Problemstellung 10

Experimenteller Teil:

I. Extraktion und Fraktionierung 12

1. Gewinnung der Rohextrakte aus S. typhi O 901, S. typhi Ty 2 und P. Ballerup 12

2. Acetonfraktionierung 13

3. Ammoniumsulfatfraktionierung 18

4. Analytische Daten der Extrakte 21

II. Die Hämagglutination zur Bestimmung der serologischen Aktivität . 21

1. Herstellung der agglutinierenden Sera 22

2. Technik der Hämagglutination 24

3. Serumtitration 24

4. Antigentitration 26

a) Allgemeines 26

b) Einfluss der verwendeten Erythrocyten 27

c) Sensibilisierungszeit und Temperaturbedingungen 27

d) Einfluss der Erythrocytenkonzentration 28

e) Ablesen der Hämagglutination 28

f) pH-Einfluss 29

g) Einfluss der Temperatur auf die Antigene

aa) Vi-Antigen 29

bb) O-Antigen 29

h) Wirkung von überschüssigem Antigen 32

5. Inhibitionstest 33

a) Antigen S. typhi O 901 33

Seite

b) Antigen S. typhi Ty 2 33
c) Antigen P. Ballerup 33
6. Gegenseitige Beeinflussung der Antigene Vi und O 34
7. Einfluss von überschüssigem präzipitierendem Serum . . . 41
8. Spezifität der Hämagglutination 42
9. Vergleich des Antigengehaltes der 3 Stämme S. typhi O 901, S. typhi Ty 2 und P. Ballerup 42
10. Absorption der Antigene durch die entsprechenden Sera . . . 45

III. Aufspaltung der Antigene 47
1. Säurehydrolyse 47
2. Aether-lösliche Komponente 48
3. Säure-unlösliche Komponente 48
4. Wasser-lösliche Komponente 49

IV. Papierchromatographische Analyse der degadierten Polysaccharide . 52
1. Experimentelles 52
2. Ergebnisse der qualitativen Chromatographie 52

Zusammenfassung 55

Literatur 59

Lebenslauf 64

ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde ein kurzer Ueberblick über den heutigen Stand der Erkenntnisse auf dem Gebiet der Salmonellenantigene gegeben. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Ergebnisse der verschiedenen Forscher nur in den wenigsten Fällen miteinander vergleichen lassen. Der Grund liegt in der Verschiedenheit der angewendeten Extraktions- und Fraktionierungsmethoden. Besonders lassen sich neuere Ergebnisse nur schwer mit ältern vergleichen, weil der damaligen Forschung entsprechend die Kenntnisse der Antigenstruktur noch allzugrosse Lücken aufwies. Nach O. Westphal, O. Lüderitz und W. T. J. Morgan kann das Vollantigen heute als ein Lipopolysaccharid-Protein-Lipoid-Komplex bezeichnet werden.

Eine Antwort auf die Frage, inwieweit sich die beiden Antigene Vi und O serologisch und chemisch unterscheiden, kann nur dann gegeben werden, wenn sie nach der gleichen Methode und unter genau denselben Bedingungen extrahiert und fraktioniert wurden. Für unsere Versuche wählten wir die 3 Stämme S. typhi O 901 mit dem Antigen O, P. Ballerup mit dem Antigen Vi und S. typhi Ty 2 mit den Antigenen Vi und O. Unsere Extrakte stellten wir nach der Methode von A. Boivin her. Zur Reinigung der Rohextrakte unterwarfen wir diese einer Aceton- und anschliessend einer Ammoniumsulfatfraktionierung. An analytischen Daten wurde der Gehalt an Stickstoff, Phosphor und reduzierenden Zuckern bestimmt. Hier zeigte sich vor allem ein Unterschied im Stickstoff- und Zuckergehalt, während die Phosphorwerte der einzelnen Antigene nur wenig verschieden waren.

Zum Nachweis und Bestimmung der serologischen Aktivität der Antigene und ihrer Komponenten bedienten wir uns der Hämagglutinationsmethode. Die erforderlichen agglutinierenden Sera wurden mit dem Stamm Ballerup (Anti-Vi-Serum) bzw. S. typhi O 901 (Anti-O-Serum) nach den allgemein üblichen Verfahren gewonnen und bei + 4° C aufbewahrt.

Wir hielten uns vorerst an die von J. Spaun beschriebene Tecknik der Hämagglutination, die wir später in verschiedenen Punkten abgeändert haben. Es konnte gezeigt werden, dass die Hämagglutination eine spezifische Methode zur Antigengehaltsbestimmung einer Lösung ist.

Um eine maximale Sensibilisierung der Erythrocyten zu bekommen, genügt es, das Antigen 1 h bei 37° C mit einer 1%igen Blutkörperchensuspension in Kontakt zu bringen. Die Bindung Erythrocyt-Antigen erwies sich als recht stabil, so konnte nach 12-maligem Auswaschen kein abgelöstes Antigen festgestellt werden.

In zahlreichen Versuchen studierten wir den Einfluss von Wärme auf die Antigene Vi und O. Die Bindung des Antigens Vi an den Bakterienkörper ist thermolabil, dagegen bleibt die Hämagglutination davon unbeeinflusst. Durch 1—2-stündiges Erhitzen des O-Antigens im Wasserbad kann der O-Hämagglutinationstiter des Rohextraktes von 160 auf 5120 erhöht werden. Wir sind der

Auffassung, dass es sich dabei um eine Spaltung einer lockeren Verbindung verschiedener Antigene und unspezifischer Polypeptide handelt, wodurch die Antigenrezeptoren frei werden und nach der Anlagerung an Erythrocyten mit Anti-O-Serum agglutinieren können. Die Erhöhung des O- und Vi-Titers nach der Fraktionierung der Rohextrakte mit Aceton- und Ammoniumsulfat haben wir z. T. ebenfalls der Abtrennung unspezifischer Substanzen zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass durch diese Fraktionierungen nicht nur eine blosse Antigenkonzentrierung eintrat, sondern das Antigen aktiviert wurde. Die Rohextrakte des Stammes Ballerup, der nur das Antigen Vi enthält und des Stammes S. typhi O 901 konnten schon durch die Acetonfraktionierung aktiviert werden, dagegen musste der Stamm S. typhi Ty 2 noch mit Ammoniumsulfat gereinigt werden, um eine Aktivierung des Antigens zu erreichen. Gleichzeitig mit dieser Zunahme der Vi-Aktivität war jedoch eine Abnahme des O-Titers von 320 auf 0 zu verzeichnen. Diese, sowie zahlreiche weitere Versuche haben gezeigt, dass eine Wechselwirkung der beiden Antigene Vi und O existieren muss. Die Eigenschaft des Vi-Antigens, die O-Hämagglutination zu beeinträchtigen, haben wir der grössern Affinität dieses Antigens zum Erythrocyt zugeschrieben.

Bei der Sensibilisierung der Erythrocyten muss das überschüssige Antigen durch 3-maliges Waschen entfernt werden, da freies Antigen, insbesondere aber freies O-Antigen, die Hämagglutination hemmen kann. Diese Hemmung konnten wir durch den Inhibitionstest nachweisen, wobei festgestellt werden konnte, dass schon 0,15 γ überschüssiges Antigen O genügen, um die O-Hämagglutination zu hemmen, dagegen sind ca. 500 γ oder mehr Vi-Antigen notwendig, um eine entsprechende Hemmung zu bewirken.

Die Absorption des einen oder andern Antigens aus einem Gemisch der beiden Antigene Vi und O bewirkt eine Zunahme des Titers des nichtabsorbierten Antigens. Grössere Mengen überschüssigen Antigens wirken dabei hemmend auf die Hämagglutination und müssen deshalb mit Säure abgetrennt werden.

Die Hydrolyse mit Essigsäure ergab für die Stämme S. typhi Ty 2 und P. Ballerup eine grosse Stabilität. Der Stamm S. typhi O 901 dagegen ist leicht in seine Komponenten aufspaltbar. Für alle 3 Stämme konnte ein Polysaccharid festgestellt werden, das an Eiweiss und Fett gebunden ist. Das sog. «degraded polysaccharide» (W. T. J. Morgan) liess sich mit 2 bzw. 6n HCl in Monosaccharide aufspalten. Für die Stämme S. typhi O 901 und S. typhi Ty 2 fanden wir Glucose, Galaktose, Mannose, Rhamnose und eine Aminohexose. Im Papierchromatogramm des Stammes Ballerup stellten wir einstweilen nur Glucose und Galaktose mit Sicherheit fest.

An Aminosäuren konnten wir bis zur Zeit nur Asparagin- und Glutaminsäure nachweisen. Weitere Ninhydrin positive Substanzen, die ebenfalls, wie die Monosaccharide, durch die Papierchromatographische Analyse gefunden wurden, liessen sich noch nicht identifizieren.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 8. Juli 1924 in Worb geboren, besuchte die Primar- und Sekundarschule in Münchenbuchsee und das städtische Gymnasium in Bern, wo ich 1944 die Reifeprüfung Typus C bestand.

Nach der Rekrutenschule immatrikulierte ich mich an der med. Fakultät der Universität Bern. 1947 wechselte ich zur phil II Fakultät über, wo ich bei den HH. Prof. Dr. R. Signer, Prof. Dr. W. Feitknecht, Prof. Dr. Hs. Nitschmann und Prof. Dr. K. Huber im Hauptfach Chemie studierte. In den Nebenfächern Physik und physiologische Chemie hörte ich die Vorlesungen der HH. Prof. Dr. Greinacher und Prof. Dr. Abelin. 1952 begann ich im Schweiz. Serum- und Impfinstitut meine Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hs. Nitschmann und Herrn P. D. Dr. med. R. Regamey. Daneben war ich am Privatgymnasium Dr. Feusi als Lehrer für Physik und Chemie tätig.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0074